

Katowice, 31. 07. 2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie
nauki chemiczne mgr inż. Karoliny Torzyk-Jurowskiej pt.:
„Projektowanie i synteza inhibitorów proteazy kapsydowej
wirusa O’nyong-nyong”**

Prof. dr hab. n. med.
Tomasz J. Wąsik

Kierownik
Katedry i Zakładu
Mikrobiologii Lekarskiej
Wydziału Nauk
Medycznych w Katowicach

40-752 Katowice,
Medyków 18
tel.: (+48 32) 208 85 50
twasik@sum.edu.pl

Oceniana rozprawa powstała w Katedrze Chemii Organicznej i Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod opieką prof. dr. hab. inż. Marcina Sieńczyka będącego promotorem pracy oraz przy współpracy z Laboratorium Wirusologii Virogenetics Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego kierowanym przez prof. dr. hab. Krzysztofa Pyrcia, który pełnił rolę drugiego promotora oraz z Pracownią Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Katedry Technologii Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego kierowaną przez prof. dr. hab. Adama Lesnera.

Ze względu na złożoność interakcji wirus-gospodarz w większości przypadków terapia zakażeń wirusowych opiera się na leczeniu objawów, a nie przyczyn. Projektowanie leków przeciwwirusowych jest z wielu powodów trudne. Cykl replikacyjny wirusów jest nierozzerwalnie związany z procesami zachodzącymi w komórce gospodarza, więc preparaty stosowane jako inhibitory enzymów czy antagoniści receptorów muszą wykazywać się wysoką swoistością wobec białek wirusowych przy braku toksyczności względem niezakażonych komórek gospodarza. Z kolei ze względu na stopień zróżnicowania molekularnego wirusów większość leków przeciwwirusowych zaprojektowana jest tak, by działać na określony etap cyklu replikacyjnego określonego wirusa, co z kolei ogranicza spektrum ich zastosowania.

W związku z powyższym oraz z faktem, że do chwili obecnej nie dysponujemy żadnymi lekami skierowanymi przeciw alfawirusom uważam podjęte przez Doktorantkę badania mające na celu zaprojektowanie, syntezę i charakterystykę enzymatyczną fosfonowych inhibitorów i sond molekularnych serynowej proteazy kapsydowej wirusa O'nyong-nyong za ze wszech miar celowe.

Przedstawiona mi do oceny praca ma dość nietypowy dla tego rodzaju dysertacji układ z podziałem na rozdziały: Streszczenie, Wstęp, Wirus O'nyong-nyong, Proteaza kapsydowa wirusa O'nyong-nyong, Cel Pracy, Badania własne, Materiał i metody, Część eksperymentalna, Wykaz stosowanych skrótów, Podziękowania, Literatura i Dorobek naukowy. Brakuje zazwyczaj występujących w rozprawach doktorskich rozdziałów „Dyskusja” i „Wnioski”, zamiast tego Doktorantka postanowiła na zakończenie poszczególnych etapów badań opisanych w części „Badania własne” umieścić każdorazowo krótkie, obejmujące w większości jeden akapit podrozdziały „Podsumowanie i wnioski”, których jest w całej pracy 13. Niestety, to co Doktorantka prezentuje jako wnioski jest w istocie obserwacjami wynikającymi z przeprowadzonych syntez i doświadczeń. W opinii piszącego te słowa takie podejście umniejsza wartość ocenianej pracy, sugeruje bowiem, iż Doktorantka nie zadała sobie trudu dokonania syntetycznej, krytycznej oceny swoich dokonań, które, nawiasem mówiąc, są niemałe.

Zasadniczą część rozprawy poprzedza „Streszczenie” w języku polskim i angielskim. We Wstępie, w którym Doktorantka wprowadza czytającego w problematykę podjętych badań, akapity opisujące pandemię grypy z lat 1918-1920 raz SARS-CoV-2 z ostatnich lat mogłyby być pominięte jako bardzo luźno związane z prezentowaną pracą. Tutaj też umieszczona jest informacja o ośrodkach, z którymi Pani Magister współpracowała podczas realizacji swoich badań. Oczekiwałbym umieszczenia tu również informacji o źródłach finansowania ocenianego projektu, informacja ze strony 52 mówiąca, że część wyników powstała w ramach realizacji zadań badawczych objętych projektem finansowanym przez NCN OPUS 15, pt. „Proteaza CP wirusa O'nyong-nyong: profilowanie substratowe, projektowanie i synteza inhibitorów oraz sond molekularnych wraz z ich analizą biochemiczną” (2018/29/B/NZ6/02622, kierownik projektu prof. dr hab. inż. Marcin Sieńczyk) wymaga doprecyzowania.

W dalszych rozdziałach, które mogłyby stanowić podrozdziały Wstępu opisano w sposób jasny i w oparciu o dobrze dobraną, najnowszą literaturę charakterystykę wirusa O'nyong-nyong opisując jego taksonomię, budowę wirionu, cykl replikacyjny, patogenezę wywoływanych przez niego chorób, znaczenie oraz strukturę, funkcje i swoistość substratową proteaz kapsydowych alfawirusów ze szczególnym odniesieniem do proteazy ONNV. Część ta jest napisana w sposób zwięzły przejrzysty i spójny. Do tej części dysertacji nie mam istotnych uwag natury merytorycznej, mam jednak drobne uwagi natury edycyjnej, które mam nadzieję, będą uwzględnione przy przygotowaniu manuskryptu do publikacji, np.:

- używania terminu arbowirus jako synonimu alfawirusów.
- stwierdzenie ze str. 22: „Nukleokapsyd otoczony jest przez warstwę lipidową zbudowaną z 240 kopii glikoprotein” - należy z oczywistych względów przeredagować
- używanie terminu otoczka glikolipidowa (rys.3) - otoczka wirusa będąca fragmentem błony komórkowej w przeważającej części zbudowana jest z fosfolipidów, nie z glikolipidów, natomiast wirusowe białka VAP są glikoproteinami
- Rysunek 3. Nie mówimy o cząsteczkach wirusowych a o cząstkach lub wirionach
- sugerowałbym również rozbudowanie podpisów pod rysunkami tak, aby rysunek, rycina czy tabela stanowiły integralną całość i były zrozumiałe bez konieczności szukania informacji w tekście, np. Rysunek 14 w obecnej postaci poza walorami estetycznymi nic nie wnosi do pracy.

Rozdział „Cel Pracy” zawiera dane, które zdaniem recenzującego winny znaleźć się w innych częściach rozprawy, znajdziemy tu informację gdzie zrealizowano prezentowane badania, z jakimi ośrodkami współpracowała Doktorantka oraz krótki opis tego czego dotyczy prezentowana dysertacja jak również dość zaskakującą tu uwagę, że część opisanych w rozprawie badań nie wchodzi w zakres prezentowanej pracy. Oczywiście w rozprawach doktorskich dopuszczalne jest opisywanie rezultatów innych autorów, ale ich opis powinien znaleźć się we Wstępie, albo, co bardzo wskazane, w Dyskusji, której rozprawie niestety brakuje, a zdecydowanie nie w „Celu pracy”, a wyniki te nie powinny być włączone do rozdziału „Badania własne”, z czym mamy to do czynienia. Dotyczy to badań nad

projektowaniem konstruktów proteazy kapsydowej, struktury krystalicznej, mapowania substratowego, syntezy optymalnych substratów FRET oraz określenia metodami modelowania molekularnego sposobu wiązania fosfonowych inhibitorów i piperazyny z CP ONNV.

Ponadto w mojej ocenie zamiast powyższych informacji wstępem do tego rozdziału winno być syntetyczne uzasadnienie celowości podjętych badań, którego mi tutaj brakuje.

Należy jednakże podkreślić, że Doktorantka stawia sobie nie budzących zastrzeżeń merytorycznych 6 głównych i 2 dodatkowe cele badawcze, które zostały zredagowane jasno i precyzyjnie. Cele te doktorantka postanowiła osiągnąć poprzez, w pierwszym etapie, zaprojektowanie, syntezę i określenie właściwości chromogenicznych substratów dla proteazy kapsydowej wirusa O'nyong-nyong i w dalszej kolejności zaprojektowanie, zsyntezowanie i określenie właściwości kinetycznych inhibitorów nieodwracalnych proteazy kapsydowej ONNV w oparciu o własny test enzymatyczny do oceny aktywności białka CP ONNV tj. fosfonowych analogów 3-indologlicyny, tryptofanu oraz homotryptofanu, oraz estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, oraz nowo zsyntetyzowanych peptydowych pochodnych fosfonowych jako inhibitorów odwracalnych CP ONNV. Z kolei określenie optymalnej struktury niskocząsteczkowych sond molekularnych CP Doktorantka postanowiła osiągnąć poprzez zaprojektowanie i syntezę biotynylowanych pochodnych tryptofanu i określenie ich aktywności względem CP ONNV. Dwa dodatkowe cele badawcze w mojej opinii wykraczają poza ramy recenzowanej dysertacji i winny być przedmiotem odrębnego opracowania, a zamiast nich należałoby przeprowadzić badania cytotoksyczności zsyntetyzowanych inhibitorów.

Jako recenzujący tę dysertację, po analizie rozdziału „Badania własne” stanowiącego zasadniczą część recenzowanej rozprawy z dużym zadowoleniem stwierdzam, że cele te Pani mgr inż. Karolina Torzyk-Jurowska w pełni zrealizowała. W opinii wirusologa piszącego te słowa istotną wartość naukową niesie określenie parametrów kinetycznych nowo zsyntetyzowanych fluorogenicznych substratów proteazy kapsydowej wirusa O'nyong-nyong, oraz otrzymanie swoistych wobec proteazy kapsydowej wirusa nowych niskocząsteczkowych biotynylowanych sond molekularnych, będących pochodnymi estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych,

Niewątpliwie oceniając dysertację znacznie zyskałaby na wartości gdyby Doktorantka w rozdziale Badania własne wyróżniła podrozdziały: Wyniki, Wnioski i Dyskusja, ponadto analizę rozdziału utrudnia fakt włączenia tu wyników otrzymanych przez innych autorów, np. Rozdziały 5.4 i 5.12, o czym wspominałem już wcześniej.

Należy podkreślić, iż prezentowane w rozdziale „Badania własne” wyniki są rezultatem wielu eksperymentów, w których adekwatnie stosowano dobrze udokumentowane w literaturze procedury badawcze. Z przyczyn oczywistych nie jest możliwe by Doktorantka sama zaprojektowała i przeprowadziła tak rozległy projekt. Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym określa, że rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, przedstawiać wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej, znajomość literatury przedmiotu oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Prezentowana rozprawa bezsprzecznie stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z tym chciałbym, by w dalszych etapach postępowania Doktorantka doprecyzowała, które eksperymenty przeprowadziła samodzielnie, jaki był jej udział w doświadczeniach przeprowadzonych we wzmiankowanych w dysertacji zespołach badawczych, oraz które wyniki pochodzą z badań zleconych innym ośrodkom.

Kluczowym czynnikiem warunkującym wartość rezultatów prezentowanych badań, który oddziaływał na układ inhibitor – enzym jest stabilność zarówno strukturalna, jak i funkcjonalna samego enzymu, mogąca być źródłem istotnych błędów w ocenie kinetyki oddziaływań nowo zsyntetyzowanych związków z proteazą kapsydową. Autorka zdaje sobie z tego problemu sprawę pisząc: „Zauważono, że zarówno stężenie, jak i aktywność katalityczna rekombinowanych białek różni się pomiędzy kolejnymi preparacjami. Dodatkowo aktywność spadała w czasie przechowywania enzymu. Z tego względu w przeprowadzonych analizach używano białek w różnym stężeniu, które wynikało z aktywności proteolitycznej CPΔ2 i CPΔ4 danej preparacji”. Uważam, takie założenie za niewłaściwe, zamiast stosowania „białka o różnym stężeniu” należało standaryzować procedurę otrzymywania enzymu oraz warunki eksperymentów.

Rozdział „Materiał i metody” jest napisany w sposób poprawny, metody zastosowane do oceny kinetyki reakcji enzymatycznych są prawidłowo dobrane. Obszerne rozdziału

„Część eksperymentalna” zamykającego ocenianą dysertację nie podejmuję się poddać szczegółowej analizie, gdyż opisuje on szczegółowo metody syntez organicznych, z którymi na tym poziomie szczegółowości ostatnio miałem do czynienia na trzecim roku studiów, czyli w czasach, o których zaczynają zapominać najstarsi górale. Jednakże, mając na uwadze wysoką jakość pozostałych części rozprawy, jestem przekonany, iż i ta część jest merytorycznie spójna.

Jak sama Doktorantka stwierdza w swojej rozprawie wirus O'nyong-nyong, ze względu na ograniczony zasięg i niemalże zerową śmiertelność, wzbudza ograniczone zainteresowanie świata nauki i ma małe znaczenie zarówno z punktu widzenia epidemiologii jak i zdrowia publicznego. Jakkolwiek można dyskutować z Doktorantką nad celowością wyboru proteazy kapsydowej wirusa O'nyong-nyong jako modelu do badań swoistości substratowej i inhibicji wirusowych proteaz serynowych, to w opinii piszącego te słowa zaprojektowane i przeprowadzone przez Panią mgr inż. Karolinę Torzyk-Jurowską badania bezsprzecznie są celowe i niosą znamiona nowości naukowej. Uzyskane wyniki opisane w niniejszej dysertacji przyczyniają się do rozwoju chemii organicznej, a ich niezaprzeczalną wartością jest określenie optymalnej struktury łańcucha bocznego oraz grupy estrowej estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych. Ponadto po raz pierwszy zaprezentowano skuteczne drogi syntezy fosfonowych analogów tryptofanu z wykorzystaniem reakcji α -amidoalkilowania w obecności katalizatorów kwasowych.

W związku z tym, że rezultaty prezentowanej pracy niosą istotne wartości poznawcze, a ich siła oddziaływania przeważa nad niedociągnięciami redakcyjnymi uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr inż. Karoliny Torzyk-Jurowskiej pt.: „Projektowanie i synteza inhibitorów proteazy kapsydowej wirusa O'nyong-nyong” spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 Lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024, poz. 742, z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Torzyk-Jurowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.